

平成 30 年 4 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14624

研究課題名(和文) グライコミクス解析を応用した尿中糖鎖検出による新規癌診断法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cancer diagnostic method by detection of sugar chain in urine using glycomics analysis

研究代表者

加藤 淳二 (Kato, Junji)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20244345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞の特徴の一つとして、細胞表面や分泌される糖蛋白の糖鎖構造の変化が一般的に良く知られている。血液では腫瘍マーカーとして糖鎖にフコースが付加された血中抗原(CA19-9など)が測定されている。本研究では担癌患者の尿からグライコミクス技術を用いてフコシル化オリゴ糖を検出することで、新たな癌の存在診断法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Changes in sugar chain structure of cell surface and secreted glycoprotein are well known as one of the characteristics of cancer cells. In the blood examination, blood antigens in which fucose is added to the sugar chain are measured as tumor markers like CA19-9. In this study, we developed a new diagnostic method for the presence of cancer by detecting fucosylated oligosaccharides from urine of patients with cancer by using glycomics technology.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：フコシル化 biomarker

1. 研究開始当初の背景

糖鎖はグルコース、ガラクトース、マンノース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、フコース、キシロース、シアル酸などの糖が複雑に連なって、さらに蛋白や脂質と結合して、糖蛋白質や糖脂質を形成するため組み合わせもバラエティも非常に豊かである。この糖鎖の多様性こそが、発生や分化、老化、疾患などの生命現象において、重要かつ複雑な情報を発信、伝達する上で極めて重要な役割を担っている。これらの糖鎖構造を網羅的に解析する事がグライコミクスである。正常細胞には多様な機能性糖鎖が発現しているが、癌化とともに epigenetic な機構によって細胞表面の糖鎖に大きな変化が起こる事が知られている。例えば、腫瘍マーカーとして汎用されている SLX/CA19-9 (シリアル Le グループの糖鎖抗原、肺、膵、卵巣癌および膵癌、胆管系および大腸癌など) AFP-L3 分画 (フコース結合型 AFP、肝細胞癌) PSA (L 型レクチン、前立腺癌) では、いずれも糖鎖にフコースが付加された血中抗原が測定されている。申請者らは、膵癌細胞が <sup>14</sup>C-Fucose を積極的に摂取することを証明し (図 1 Yoshida M, Kato J, PLoS ONE

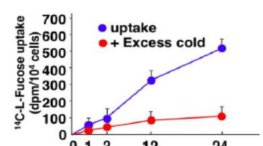


図1: 膵癌細胞 (AsPC-11) の<sup>14</sup>C-Fucoseの取り込み。<sup>14</sup>C-Fucoseは時間依存性に膵癌細胞に取り込まれ、過剰なFucoseにより阻害される。

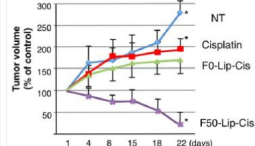


図2: 膵癌細胞 (AsPC-11) 腫瘍マウスにおけるフコース結合ナノキャリアによる抗腫瘍効果。コントロールと比較し、F50-Lip-Cisplatinは著明な腫瘍縮小効果を示す。

2012) さらに申請者らが開発したフコース結合ナノキャリアにて著明な抗腫瘍効果が得られることを見出した (図 2 加藤, 特許出願番号 P2009-88149)。続いて申請者らは上記腫瘍マーカー産生に必須な酵素である fucosyltransferase (FUT) の内、FUT3 および FUT6 が Transforming growth factor (TGF)-受容体の L-フコース修飾を促進し、上皮間葉移行 (EMT) を惹起することで転移・浸潤能を高めることを大腸癌で報告した (図 3 Hirakawa M, Kato J, Br J Cancer 2013)。更に申請者らは



図3: FUT3/6をsiRNA抑制すると、TGF-βによるEMT誘導分子Zeb1, Snailは低下し、転移浸潤を惹起するHSP27, P38のリン酸化も低下した。

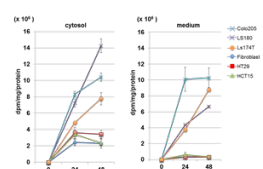


図4: 大腸癌細胞 (Colo205, LS180, LS174T) においてフコシル化蛋白の取り込みおよび分泌の亢進を認めた。

は培養液中にフコシル化蛋白を短時間で放出することを最近見出した (図 4 Osuga T, M, Kato J, JNCI, 2017)。一方担癌患者では、尿中フコース濃度が有意に増加していることが報告されているが (Clin Chem 36:474-6, 1990) その形状など詳細は不明である。本研究では担癌患者の尿からグライコミクス技術を用いてフコシル化低分子オリゴ糖を検出することで、新たな簡便な癌の存

在診断法を開発することを目論む。

2. 研究の目的

既に申請者らは フコースに関連する基礎データを有しており、それを検証するアッセイ系を確立している。また糖鎖精製および解析経験があり、Preliminary なデータも有している。従って、担癌症例における尿中の糖鎖を網羅的に解析し、発現量と進行度、良悪性度、また将来的には治療反応性、予後との相関を検証する。最終的には検診ベースへの応用を目指したい。

3. 研究の方法

1) 対象症例の規定: 当科は消化器癌を中心とする腫瘍内科であり、初発、再発の消化器癌患者が多数来院される。まずは初発の膵癌、胃癌、大腸癌患者を対象とし、初発時の病変評価 (RECIST v1.1 および各種癌取り扱い規約に準ずる) および各種生化学データ、腫瘍マーカーを含めた臨床情報を集積する。同時に治療前の尿、血漿の採取を行う。また原発巣の治療前生検組織を採取する。化学療法レジメン対象患者の場合は、化学療法後に病変が縮小し根治切除が可能と判断され、手術を行った症例に対してはその原発巣または転移巣の新鮮材料とその時点での尿、血漿も採取する。さらに再発癌の患者も同様に、再発時の病変評価および各種生化学データ、腫瘍マーカーを含めた臨床情報を集積し、再治療前の尿、血漿の採取を行う。初発、再発を含めた年間対象患者数は約 50 人の見込みである。末梢血液は遠心分離後に、尿、生検・手術材料はただちに液体窒素により凍結し、-80 °C で保存する。すべての患者に対しインフォームドコンセントを取るとともに、内部の倫理審査委員会の同意を得る。化学療法前生検や CT については不必要な患者負担を避けるため、原則として通常癌診療にてルーティンに行われる治療前内視鏡観察・生検診断および画像検査の一環として行う。

2) 採取検体における糖鎖精製および解析: 本検討における主目的である尿の解析を第一に行うとともに、有意な所見が得られた場合は血漿検体および組織検体での検討を考慮する。具体的には尿 100 μL をチューブにとり、純水 (165 μL)、1M 重炭酸アンモニウム水溶液 (25 μL)、120mM DTT 水溶液 (25 μL) を加え、ボルテックスで攪拌し溶解する。これを 60 で 30 分間静置する。さらに 123 mM IAA 水溶液 (50 μL) を加え、遮光下室温で 1 時間静置する。トリプシンを 80 units/μL で 1mM 塩酸に溶解し、25 μL をサンプル溶液に加え 37 のインキュベーターで 1 時間静置する。その後 90 のヒートブロックで 5 分間加熱し、トリプシンを失活させる。PNGase F (10 μL) を加え 37 のインキュベーターで 12 時間以上静置する。これと別途に反作用チューブを 2mL エピペンドルフチューブに挿入する。ポリマービーズのチューブに純水を

加え、ボルテックスで攪拌し、ポリマービーズを分散させる。その後、卓上遠心機で数秒間遠心してキャップの裏側に付着したビーズをチューブに移す。ポリマービーズ分散液を数回ピペティングした後、50  $\mu$ L を取り、反作用チューブの底部に注入し、卓上遠心機で数秒間遠心して水を排出する。反作用チューブを 1.5 mL エッペンドルフチューブに挿入し 2% 酢酸/アセトニトリル 180  $\mu$ L を添加する。さらに糖鎖サンプル溶液(20  $\mu$ L)を添加し、チューブを 80 のヒートブロックに挿入し 1 時間加熱する。反作用チューブを 2 mL エッペンドルフチューブに挿入し、ポリマービーズを 2 M グアニジン溶液 200  $\mu$ L で 2 回洗浄する。その後、ポリマービーズを純水 200  $\mu$ L で 2 回洗浄。さらにポリマービーズを 1% トリエチルアミン/メタノール 200  $\mu$ L で 2 回洗浄する。さらにメタノール 900  $\mu$ L をエッペンドルフチューブにとり、無水酢酸 100  $\mu$ L を加え混合する。反作用チューブを 1.5mL エッペンドルフチューブに挿入する。ポリマービーズに 10% 無水酢酸溶液 100  $\mu$ L を加え室温で 30 分間静置する。反作用チューブを 2mL エッペンドルフチューブに挿入し、遠心して 10% 無水酢酸溶液を排出する。ポリマービーズを 10mM 塩酸 200  $\mu$ L で 2 回洗浄。ポリマービーズをメタノール 200  $\mu$ L で 2 回洗浄。ポリマービーズを DMSO 200  $\mu$ L で 2 回洗浄。反作用チューブを 1.5mL エッペンドルフチューブに挿入する。500mM の MTT 溶液を調製する。MTT(74.6mg)をエッペンドルフチューブに量り取り、DMSO 1mL を加えて溶解させる。ポリマービーズに 500mM の MTT 溶液 (100  $\mu$ L)を加える。チューブを 60 のヒートブロックで 1 時間加熱する。反作用チューブを 2 mL エッペンドルフチューブに挿入し遠心して 500mM MTT 溶液を排出。ポリマービーズをメタノール 200  $\mu$ L で 2 回洗浄する。ポリマービーズを純水 200  $\mu$ L で 2 回洗浄。反作用チューブを 1.5mL エッペンドルフチューブに挿入 MALDI-TOF MS 用ラベル化合物のチューブに純水 220  $\mu$ L を加え、ボルテックスで攪拌して溶解させる。ポリマービーズに MALDI-TOF MS 用ラベル化合物溶液 20  $\mu$ L を添加する。2% 酢酸/アセトニトリル 180  $\mu$ L を添加し、チューブを 80 のヒートブロックで 1 時間加熱する。反作用チューブを 1.5mL エッペンドルフチューブに挿入。ポリマービーズに 10 mM 塩酸 50  $\mu$ L を加える。遠心してラベル化糖鎖溶液をエッペンドルフチューブに回収。回収した糖鎖溶液にアセトニトリル 950  $\mu$ L を加え混合する。クリーンアップカラムを純水 200  $\mu$ L で 1 回洗浄。更にアセトニトリル 200  $\mu$ L で 2 回洗浄。クリーンアップカラムに調製した糖鎖溶液を全量添加し 10 分間自然落下させた後に遠心して残りの溶液を通過させる。チューブに溜まった廃液を捨て、カラムを再度チューブに挿し、遠心機にセットする。クリーンアップカラムをアセトニトリル 300  $\mu$ L で 2 回洗浄

する。チューブに溜まった廃液を捨て、クリーンアップカラムを再度チューブに挿し、遠心してよりアセトニトリルを完全に除去する。クリーンアップカラムを新しい 1.5mL エッペンチューブに挿入し純水 50  $\mu$ L を加える。遠心してラベル化糖鎖溶液を 1.5mL エッペンドルフチューブに回収する。以上の操作により夾雑物を除去しラベル化した糖鎖が得られる。この検体を住友ベークライトに提出し、MALDI-TOF MS 測定を行うことにより癌患者検体における糖鎖の構造情報が解析可能となる。この結果を健常人ドナーサンプルと比較検討することで、尿中における各癌腫特異的な糖鎖構造を検索する。また患者臨床データと比較検討することで早期癌を含めた腫瘍進行度との関連性を統計的に解析する。

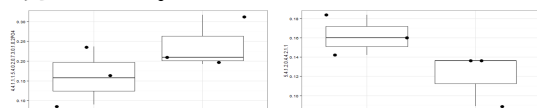
3) 各種細胞株における糖鎖精製および解析：上記にて同定した糖鎖構造が各種樹立細胞株 (AsPC-1, PANC-1, HGC-27, KATO-III, Colo205, LS180 など) において検出可能かを検討する。各細胞は  $1 \times 10^6$  個を用意し、0.5% Triton X-100 溶液 25  $\mu$ L を加えてホモジナイザーを用いて細胞を破砕する。ホモジナイザーに付着している溶液を純水 25  $\mu$ L で洗い流し全量を回収する。こちらの細胞破砕溶液 50  $\mu$ L を使用して同様の糖鎖精製および解析手法を用いて検討する。細胞株を選別した後に細胞濃度を調節し、限界検出感度を検討する。

4) Biomarker としての検証：上記で明らかとなった糖鎖構造が患者由来血漿および癌組織においても検出されるかを同様な手法で検討を行う。更に Preliminary な解析として retrospective な検討を行い、予後や治療反応性なども含めて検証する。

#### 4. 研究成果

1) 対象症例の規定：初発の膵癌、胃癌、大腸癌患者を対象とし、初発時の病変評価 (RECIST v1.1 および各種癌取り扱い規約に準ずる) および各種生化学データ、腫瘍マーカーを含めた臨床情報を集積した。同時に治療前の尿、血漿の採取を行った。また原発巣の治療前生検組織を採取した。さらに再発癌の患者も同様に、再発時の病変評価および各種生化学データ、腫瘍マーカーを含めた臨床情報を集積し、再治療前の尿、血漿の採取を行った。

2) 採取検体における糖鎖精製および解析：本検討における主目的である尿の解析を第一に行った。その結果、複数の Glycan 候補が見つかった。



3) 各種細胞株における糖鎖精製および解析：上記にて同定した糖鎖構造が各種樹立細胞株 (AsPC-1, PANC-1, HGC-27, KATO-III,

Colo205, LS180)において検出可能かを検討した。その結果は、複数回において検討したが、臨床検体で尿中に検出された glycan は検出されなかった。検出法の変更などを将来的には検討したい。

4) Biomarker としての検証：上記で明らかとなった糖鎖構造が患者由来血漿および癌組織においても検出されるかを同様な手法で検討を行った。癌組織からは検出は困難であった。また患者血漿では同患者であっても検出されるもの、されないものがあり、一定の結果が得られなかった。今回は尿の検体の結果を第一に検討したため、他検体での共通結果は得られなかった。retrospective な検討では現時点での症例では予後や治療反応性との統計学的有意差は得られなかった。臨床試験に進むために引き続き症例の蓄積と検討を行いたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計13件)

1 Tamura F, Sato Y, Hirakawa M, Yoshida M, Ono M, Osuga T, Okagawa Y, Uemura N, Arihara Y, Murase K, Kawano Y, Iyama S, Takada K, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Kobune M, Takimoto R, Kato J. RNAi - mediated gene silencing of ST6GalNAc I suppresses the metastatic potential in gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 2016;19:85-97. (査読有)

2 Sato Y, Ohnuma H, Hirakawa M, Takahashi M, Osuga T, Okagawa Y, Murase K, Takada K, Kawano Y, Iyama S, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kobune M, Okita K, Mizuguchi T, Furuhashi T, Hirata K, Kato J. A dose-escalation study of oxaliplatin/capecitabine/irinotecan (XELOXIRI) and bevacizumab as a first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:587-94 (査読有)

3 Hirayama Y, Ishitani K, Sato Y, Iyama S, Takada K, Murase K, Kuroda H, Nagamachi Y, Konuma Y, Fujimi A, Sagawa T, Ono K, Horiguchi H, Terui T, Koike K, Kusakabe T, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Effect of duloxetine in Japanese patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a pilot randomized trial. *Int J Clin Oncol* 2015;20:866-71. (査読有)

4 Kubo T, Kawano Y, Himuro N, Sugita S, Sato Y, Ishikawa K, Takada K, Murase K, Miyanishi K, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Nobuoka T, Hirata K, Takayama T, Mori M, Hasegawa T, Kato J. BAK is a predictive and prognostic biomarker for the therapeutic effect of docetaxel treatment in patients with advanced gastric cancer. *Gastric Cancer*

2016;19:827-38. (査読有)

5 Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Yoshida M, Murata M, Murase K, Iyama S, Takada K, Sato T, Ono K, Hashimoto A, Tatekoshi A, Kamihara Y, Kawano Y, Miyanishi K, Sawada N, Kato J. Extracellular vesicle miR-7977 is involved in hematopoietic dysfunction of mesenchymal stromal cells via poly binding protein 1 reduction in myeloid neoplasms. *Haematologica* 2016;101:437-47. (査読有)

6 Hashimoto A, Sato T, Iyama S, Yoshida M, Ibata S, Tatekoshi A, Kamihara Y, Horiguchi H, Murase K, Kawano Y, Takada K, Miyanishi K, Kobune M, Ichimiya S, Kato J. Narrow-Band Ultraviolet B Phototherapy Ameliorates Acute Graft-Versus-Host Disease of the Intestine by Expansion of Regulatory T Cells. *PLoS One* 2016;11:e152823. (査読有)

7 Kamihara Y, Takada K, Sato T, Kawano Y, Murase K, Arihara Y, Kikuchi S, Hayasaka N, Usami M, Iyama S, Miyanishi K, Sato Y, Kobune M, Kato J. The iron chelator deferasirox induces apoptosis by targeting oncogenic Pyk2/ $\beta$ -catenin signaling in human multiple myeloma. *Oncotarget* 2016;7:64330-41. (査読有)

8 Ibata S, Sato T, Kuroda H, Nagamachi Y, Iyama S, Fujimi A, Kamihara Y, Konuma Y, Yoshida M, Tatekoshi A, Hashimoto A, Horiguchi H, Ono K, Murase K, Takada K, Miyanishi K, Kobune M, Hirayama Y, Kato J. A phase II trial of small-dose bortezomib lenalidomide and dexamethasone ( $\delta$ VRD) as consolidation/maintenance therapy in patients with multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;78:1041-49. (査読有)

9 Okagawa Y, Takada K, Arihara Y, Kikuchi S, Osuga T, Nakamura H, Kamihara Y, Hayasaka N, Usami M, Murase K, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. Activated p53 with histone deacetylase inhibitor enhances L-fucose-mediated drug delivery through Induction of fucosyltransferase 8 expression in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 2016;11:e0168355. (査読有)

10 Osuga T, Takimoto R, Ono M, Hirakawa M, Yoshida M, Okagawa Y, Uemura N, Arihara Y, Sato Y, Tamura F, Sato T, Iyama S, Miyanishi K, Takada K, Hayashi T, Kobune M, Kato J. Relationship Between Increased Fucosylation and Metastatic Potential in Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016

11 Ono M, Takimoto R, Osuga T, Okagawa Y, Hirakawa M, Yoshida M, Arihara Y, Uemura N, Hayasaka N, Miura S, Matsuno T, Tamura F, Sato Y, Sato T, Iyama S, Miyanishi K, Takada K, Kobune M, Kato J.

Targeting Notch-1 positive acute leukemia cells by novel fucose-bound liposomes carrying daunorubicin. Oncotarget. 2016

12 Arihara Y , Takada K , Kamihara Y , Hayasaka N , Nakamura H , Murase K , Ikeda H , Iyama S , Sato T , Miyanishi K , Kobune M , Kato J . Small molecule CP-31398 induces reactive oxygen species-dependent apoptosis in human multiple myeloma . Oncotarget 1-11,2017

13 Okagawa Y, Takada K, Arihara Y, Kikuchi S, Osuga T, Nakamura H, Kamihara Y, Hayasaka N, Usami M, Murase K, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. Activated p53 with Histone Deacetylase Inhibitor Enhances L-Fucose-Mediated Drug Delivery through Induction of Fucosyltransferase 8 Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells. PLoS One. 2016

〔学会発表〕(計1件)

1 Usami M, Kikuchi S, Takada K, Sugama Y, Arihara Y, Hayasaka N, Nakamura H, Ikeda Y, Kamihara Y, Hirakawa M, Yoshida M, Kobune M, Miyanishi K, Kato J. FoxO3a activation by HDAC class IIa inhibition induces cell cycle arrest in pancreatic cancer cells. AACR annual meeting 2017. 2017/4/1 ~ 5 Washington D.C.,

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤淳二 (Kato Junji)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20244345

(2)研究分担者

村瀬和幸 (Murase Kazuyuki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90444918

松野鉄平 (Matsuno Teppei)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60774221